

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

JP996 U.S. PRO
09/982964
10/22/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年12月25日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-393381

出 願 人

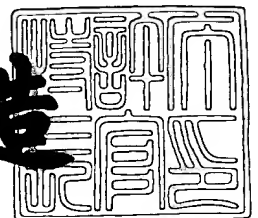
Applicant(s):

株式会社島津製作所

2001年 7月27日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3066436

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1000773

【提出日】 平成12年12月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 21/64

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津
 製作所内

 【氏名】 中村 伸

【特許出願人】

 【識別番号】 000001993

 【氏名又は名称】 株式会社島津製作所

【代理人】

 【識別番号】 100085464

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 野口 繁雄

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 037017

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 9110906

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光検出装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 検出領域内の蛍光を検出する蛍光検出装置において、
前記検出領域からの光をスリットの穴に結像する第 1 の光学系と、
少なくとも反射型回折格子を備え、前記スリットの穴からの光を分光し、検出素子に結像する第 2 の光学系とを備えたことを特徴とする蛍光検出装置。

【請求項 2】 前記反射型回折格子として反射型凹面格子を備え、前記第 2 の光学系は前記反射型凹面格子のみによって構成されている請求項 1 に記載の蛍光検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、検出領域の蛍光を検出する蛍光検出装置に関するものである。

このような蛍光検出装置は、例えば、極微量のタンパクや核酸、薬物などを高速かつ高分解能に分析する電気泳動装置の検出装置として用いられる。

【0002】

【従来の技術】

極微量のタンパク質や核酸などを分析する場合には、従来から電気泳動装置が用いられている。電気泳動装置としては、内径が $100\mu\text{m}$ 以下のガラスキャピラリーを用いるものや、基板内に幅寸法 $100\mu\text{m}$ 程度、深さ $50\mu\text{m}$ 程度の溝を形成したチップデバイスを用いるものがある。電気泳動装置での検出は、サンプルを予め蛍光標識しておき、蛍光光度法を用いるのが一般的である。

【0003】

図 3 はチップデバイスを用いた電気泳動装置に適用された従来の蛍光検出装置を示す斜視図である。

チップデバイス 1 には複数の分析流路 43 が形成されており、それらの分析流路 43 の所定位置に複数の分析流路 43 にまたがる帯状の検出領域 29 が設けられている。

チップデバイス1の側方に設けられたレーザ装置49により、検出領域29に励起光が照射されて複数の分析流路43に励起光が同時に照射される。

【0004】

チップデバイス1の上方に設けられた集光レンズ51により、検出領域29内の特定の分析流路43からの光を集光して平行光にする。その平行光を、レーザ光を除去するための除去フィルター53を介して、透過型回折格子55に送る。透過型回折格子55により除去フィルター53からの平行光を分光し、結像レンズ57を介して、CCD (Charge Coupled Device) 59に結像する。各波長の光はCCD 59の異なる位置に結像される。CCD 59の検出信号に基づいて所定の蛍光波長の強度を算出する。蛍光波長の強度を調べることにより、検出領域29におけるその蛍光波長の蛍光を発する蛍光物質の有無を判断できる。

【0005】

図3の蛍光検出装置では、集光レンズ51、除去フィルター53、透過型回折格子55、結像レンズ57及びCCD 59を含む光学系又はチップデバイス1を検出領域29方向に移動させることにより、複数の分析流路43について検出領域29で蛍光検出を順次行なう。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

透過型回折格子を用いた蛍光検出装置では、透過型回折格子の回折効率（入射光に対する回折光の強度の割合）が低いので、検出信号のS/N（ノイズに対する検出信号の強度の割合）が低いという問題があった。また、複数の分析流路にまたがる帯状の検出領域で蛍光検出を行なう場合、透過型回折格子の空間周波数特性により、隣接する分析流路からの蛍光が光学系に入射する現象（クロストークという）により誤検出を起こすという問題があった。

そこで本発明は、検出信号の高いS/Nを実現できる蛍光検出装置を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明にかかる蛍光検出装置は、検出領域内の蛍光を検出する蛍光検出装置で

あって、検出領域からの光をスリットの穴に結像する第 1 の光学系と、少なくとも反射型回折格子を備え、スリットの穴からの光を分光し、検出素子に結像する第 2 の光学系とを備えているものである。

【 0 0 0 8 】

第 1 の光学系により検出領域からの光をスリットの穴に結像する。反射型回折格子を備えた第 2 の光学系により、スリットの穴からの光を分光し、検出素子に結像する。

反射型回折格子は透過型回折格子に比較して回折効率が高いので、検出素子の検出信号について高い S / N を実現できる。さらに、反射型回折格子は結像特性がよいので、複数の分析流路にまたがる帯状の検出領域で蛍光検出を行なう場合であっても、クロストークを低減することができる。

【 0 0 0 9 】

【発明の実施の形態】

本発明にかかる蛍光検出装置において、反射型回折格子として反射型凹面格子を備え、第 2 の光学系は反射型凹面格子のみによって構成されていることが好ましい。反射型凹面格子を用いることにより、凹面鏡などの光学系を用いることなく、スリットの穴からの光を分光して検出素子に結像することができる。これにより、装置の構成を簡単にすることができる。

【 0 0 1 0 】

【実施例】

図 1 は本発明にかかる蛍光検出装置の一実施例を備えた電気泳動装置を示す斜視図である。図 2 は、図 1 の電気泳動装置に装着される多数の分離用流路が形成されたチップデバイスを表す図であり、(A) は一方の基板の上面図、(B) は他方の基板の上面図、(C) は両基板を重ね合わせた状態での上面図、(D) は (C) の円で囲まれた部分を拡大して示す上面図、(E) は (C) の分析流路部分を示す断面図である。

【 0 0 1 1 】

まず、図 2 に示すチップデバイスについて説明する。

チップデバイス 1 は、一対の透明板状の無機材料（例えばガラス、石英、シリ

コンなど)又はプラスチックからなる基板 1 a, 1 b により構成される。基板 1 a, 1 b の厚さは 1.1 mm である。

一方の基板 1 b の表面には、半導体フォトリソグラフィ技術又はマイクロマシニング技術により、互いに交差するサンプル導入用流路 4 1 及び分離用流路 4 3 の組が 16 組形成されている。サンプル導入用流路 4 1 及び分離用流路 4 3 の寸法は幅が 100 μ m 程度、深さが 50 μ m 程度である。16 組の流路 4 1, 4 3 は、他の組の流路と交差しないように、サンプル導入用流路 4 1 と交差する側とは反対側の分離用流路 4 3 の一端側を要として扇型に配置されている。

【0012】

他方の基板 1 a には流路 4 1, 4 3 の端に対応する位置にアノードリザーバ 4 5 a、カソードリザーバ 4 5 c、サンプルリザーバ 4 5 s、ウエイストリザーバ 4 5 w としての貫通穴が形成されている。リザーバ 4 5 s, 4 5 w は流路 4 1, 4 3 の組ごとに設けられている。アノードリザーバ 4 5 a は扇型配置の要側の各組の分離用流路 4 3 の一端側で共通である。カソードリザーバ 4 5 c は長穴により構成され、各組の分析流路 4 3 の他端側で共通である。

図 2 (D) に示すように、サンプルリザーバ 4 5 s からのサンプル導入用流路 4 1 とウエイストリザーバ 4 5 w からのサンプル導入用流路 4 1 は 100 μ m の間隔をもって分析流路 4 3 に接続されている。

【0013】

チップデバイス 1 は、両基板 1 a, 1 b を重ねて接合した状態で使用される。チップデバイス 1 での分離サンプルの検出領域 2 9 は、扇型配置の要側の各組の分離用流路 4 3 の一端側付近である。

このようなチップデバイスは、多数の分離用流路が形成されていることから、Multi-channel Micro-chip とも呼ばれる。

【0014】

図 1 を用いて電気泳動装置について説明する。

チップデバイス 1 はリザーバが形成された表面を上方にしてチップデバイス保持台 3 に保持されている。チップデバイス保持台 3 にはチップデバイス 1 の温度を調節するためのペルチエ式温調機構 5 が備えられている。ペルチエ式温調機構

5に対向する位置にペルチエ式温調機構5に送風するためのファン7が設けられている。チップデバイス保持台3のチップデバイス1が保持された表面を覆う泳動チャンバー蓋9が設けられている。

【0015】

チップデバイス保持台3の付近に、チップデバイス保持台3に保持されたチップデバイス1の流路及びリザーバに泳動媒体としてのポリマーを充填するためのポリマー充填ポート11及びポリマー充填用シリンジ13が設けられている。

チップデバイス保持台3のチップデバイス1が保持された表面側に、チップデバイス1のリザーバ45a, 45c, 45s, 45wに収容された液に電圧を印加するための電極15がリザーバ45a, 45c, 45s, 45wごとに設けられている。各電極15は電極15に電圧を供給するための高電圧供給部17に電気的に接続されている。

【0016】

電気泳動装置の検出装置として蛍光検出装置が備えられている。蛍光検出装置の光源として、励起光源レーザ装置19が設けられている。レーザ装置19としては、例えばアルゴン(Ar)レーザやクリプトン(Kr)レーザ、ヘリウムネオン(He-Ne)レーザ、ネオジウム(Nd)-YAG($Y_3Al_5O_{12}$)などのNdイオン固体レーザ、半導体レーザ(Laser Diode: LD)、光第2高調波発生(SHG)現象を利用した固体レーザなど、種々のレーザ装置を用いることができる。

【0017】

レーザ装置19からの励起光の光路にはその励起光を平行光にするビームエキスパンダ21が設けられている。ビームエキスパンダ21からの励起光の光路には、ガルバノミラーやAOD(Acousto-Optics Device)などの励起光を走査するためのビームスキャニング素子23が設けられている。

ビームスキャニング素子23からの励起光の光路には、ビームスキャニング素子23からの励起光をチップデバイス1側へ反射するダイクロイックミラー25が設けられている。ダイクロイックミラー25は励起光を反射し、チップデバイス1側からの蛍光を透過するような波長特性のものを用いる。

【0018】

ダイクロイックミラー 25 に反射された励起光の光路には、その励起光を泳動チャンバー蓋 9 に設けられた開口を介してチップデバイス 1 の分離用流路 43 の検出領域 29 (図 2 も参照) に集光する対物レンズ 27 が設けられている。

ダイクロイックミラー 25 の対物レンズ 27 とは反対側に、励起光成分を除去する除去フィルター 31 が設けられている。除去フィルター 31 を透過した蛍光の光路にはその蛍光を、チップデバイス 1 の検出領域 29 に対応して長穴が形成されたスリット 35 に結像するためのレンズ 33 が設けられている。

【0019】

スリット 35 の長穴からの蛍光の光路には、その蛍光を分光して冷却 CCD 39 の受光面に結像するための凹面ホログラフィックグレーティング (反射型凹面格子) 37 が設けられている。

冷却 CCD 39 には、冷却 CCD 39 の動作を制御し、冷却 CCD 39 の検出信号を処理するための演算装置 (図示は省略) が電氣的に接続されている。

蛍光検出装置は、チップデバイス 1 の分離用流路 43 の検出領域 29 における蛍光を検出して分離したサンプルを検出するものである。グレーティング 37 により検出領域 29 からの蛍光を分光することにより、複数種類の蛍光波長を検出することができる。

【0020】

この実施例において、本発明にかかる蛍光検出装置は、励起光源レーザ装置 19、ビームエキスパンダ 21、ビームスキャニング素子 23、ダイクロイックミラー 25、対物レンズ 27、除去フィルター 31、レンズ 33、スリット 35、グレーティング 37 及び冷却 CCD 39 により構成され、第 1 の光学系は、ダイクロイックミラー 25、対物レンズ 27、除去フィルター 31、レンズ 33、スリット 35 により実現され、第 2 の光学系はグレーティング 37 により実現されている。

【0021】

図 1 及び図 2 を参照してこの電気泳動装置の動作を説明する。

泳動チャンバー蓋 9 が開けられ、チップデバイス保持台 3 の所定位置にチップ

デバイス 1 が配置された後、ポリマー充填ポート 1 1 を移動させてチップデバイス 1 のリザーバ 4 5 a に接合させる。シリンジ 1 3 内に収容されたポリマーを押し出して、ポリマー充填ポート 1 1 及びリザーバ 4 5 a を介して分析流路 4 3 及びサンプル導入流路 4 1 に充填する。

リザーバ 4 5 a, 4 5 c, 4 5 w にバッファが注入され、サンプルリザーバ 4 5 s にサンプルが注入され、各リザーバ 4 5 a, 4 5 c, 4 5 s, 4 5 w に電極 1 5 が配置された後、泳動チャンバー蓋 9 が閉じられる。ペルチエ式温調機構 5 及びファン 7 を作動させ、チップデバイス 1 及び泳動チャンバー内を所定の温度に温調する。

【 0 0 2 2 】

泳動用高圧電源 1 7 により各電極 1 5 に所定の電圧を印加してサンプルリザーバ 4 5 s に収容されたサンプルをサンプル導入用流路 4 1 内に導入した後、各電極 1 5 への印加電圧を切り換えて、サンプル導入用流路 4 1 と分析流路 4 3 の交差部にあるサンプルを分析流路 4 3 内に導入する。その後、分析流路 4 3 に導入したサンプルをアノードリザーバ 4 5 a 側へ泳動させて分離させる。

【 0 0 2 3 】

励起光源レーザ装置 1 9 を作動させ、励起光をビームエキスパンダ 2 1 及びビームスキャニング素子 2 3 を介してダイクロイックミラー 2 5 に照射する。ダイクロイックミラー 2 5 により励起光を対物レンズ 2 7 側に反射し、対物レンズ 2 7 により励起光を検出領域 2 9 内に照射する。このとき、ビームスキャニング素子 2 3 により、検出領域 2 9 内で分析流路 4 3 が並ぶ方向（図 1 中矢印参照）に励起光が走査されるように、ダイクロイックミラー 2 5 への励起光の照射位置を走査する。

【 0 0 2 4 】

検出領域 2 9 からの光を対物レンズ 2 7 により集光し、平行光にしてダイクロイックミラー 2 5 へ送る。ダイクロイックミラー 2 5 は対物レンズ 2 7 からの光を透過して除去フィルター 3 1 に送る。除去フィルター 3 1 はダイクロイックミラー 2 5 からの光のうち、励起光成分を除去し、所定の波長の蛍光のみを透過してレンズ 3 3 に送る。レンズ 3 3 は除去フィルター 3 1 からの蛍光をスリット 3

5の長穴に集光する。スリット35の長穴を通過した蛍光はグレーティング37に照射される。グレーティング37はスリット35からの蛍光を分光し、冷却CCD39の受光面に結像する。冷却CCD39の検出信号に基づいて、蛍光標識されたサンプルを検出する。

【0025】

図1に示す一実施例としての蛍光検出装置では、透過型回折格子を用いた従来の蛍光検出装置とは異なり、反射型回折格子である凹面ホログラフィックグレーティング37を用いているので、回折効率がよく、従来の蛍光検出装置に比べて冷却CCD39の検出信号のS/Nを向上させることができる。また、結像特性がよいことから、隣接する分析流路43間のクロストークを低減することができる。

【0026】

図1では、一実施例としての蛍光検出装置を電気泳動装置に適用しているが、本発明はこれに限定されるものではなく、蛍光検出を行なう他の装置にも適用できるし、蛍光検出装置単体として用いることもできる。例えば、サンプルを収容するための複数の凹部が配列されたマイクロタイタープレート用の蛍光検出装置として用いることができる。

【0027】

本発明にかかる蛍光検出装置の構成は図1に示すものに限定されるものではない。すなわち、第1の光学系は検出領域からの光をスリットの穴に結像することができ、第2の光学系は少なくとも反射型回折格子を備え、スリットの穴からの光を分光し、検出素子に結像することができる構成であればどのような構成であってもよい。また、光源を含む励起光を照射する光学系はどのような構成であってもよく、例えば光源としてLED (Light Emitting Diode) を用いてもよい。

【0028】

また、図1に示した蛍光検出装置では、第2の光学系として反射型凹面格子である凹面ホログラフィックグレーティングのみを用いているが、本発明を構成する第2の光学系はこれに限定されるものではなく、凹面鏡と反射型平面格子の組み合わせであってもよい。

また、図 1 に示した蛍光検出装置では、検出領域に励起光を照射する光学系として、ビームスキャニング素子を用いて検出領域内で励起光を走査するものを用いているが、本発明はこれに限定されるものではなく、検出領域内にライン状の励起光を照射する光学系や、チップデバイスの側面から検出領域に励起光を照射する光学系など、検出領域に励起光を照射できる光学系であればどのような光学系であってもよい。

【 0 0 2 9 】

【発明の効果】

本発明の蛍光検出装置では、検出領域からの光をスリットの穴に結像する第 1 の光学系と、少なくとも反射型回折格子を備え、スリットの穴からの光を分光し、検出素子に結像する第 2 の光学系とを備え、透過型回折格子に比較して回折効率が高い反射型回折格子により検出領域からの光を分光するようにしたので、検出素子の検出信号について高い S/N を実現できる。さらに、複数の検出位置にまたがる検出領域で蛍光検出を行なう場合であっても、反射型回折格子の高い結像特性により、クロストークを低減することができる。

【 0 0 3 0 】

本発明にかかる蛍光検出装置において、反射型回折格子として反射型凹面格子を備え、第 2 の光学系は反射型凹面格子のみによって構成されているようにすれば、装置の構成を簡単にすることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明にかかる蛍光検出装置の一実施例を備えた電気泳動装置を示す斜視図である。

【図 2】

図 1 の電気泳動装置に装着されるチップデバイスを表す図であり、(A) は一方の基板の上面図、(B) は他方の基板の上面図、(C) は両基板を重ね合わせた状態での上面図、(D) は (C) の円で囲まれた部分を拡大して示す上面図、(E) は (C) の分析流路部分を示す断面図である。

【図 3】

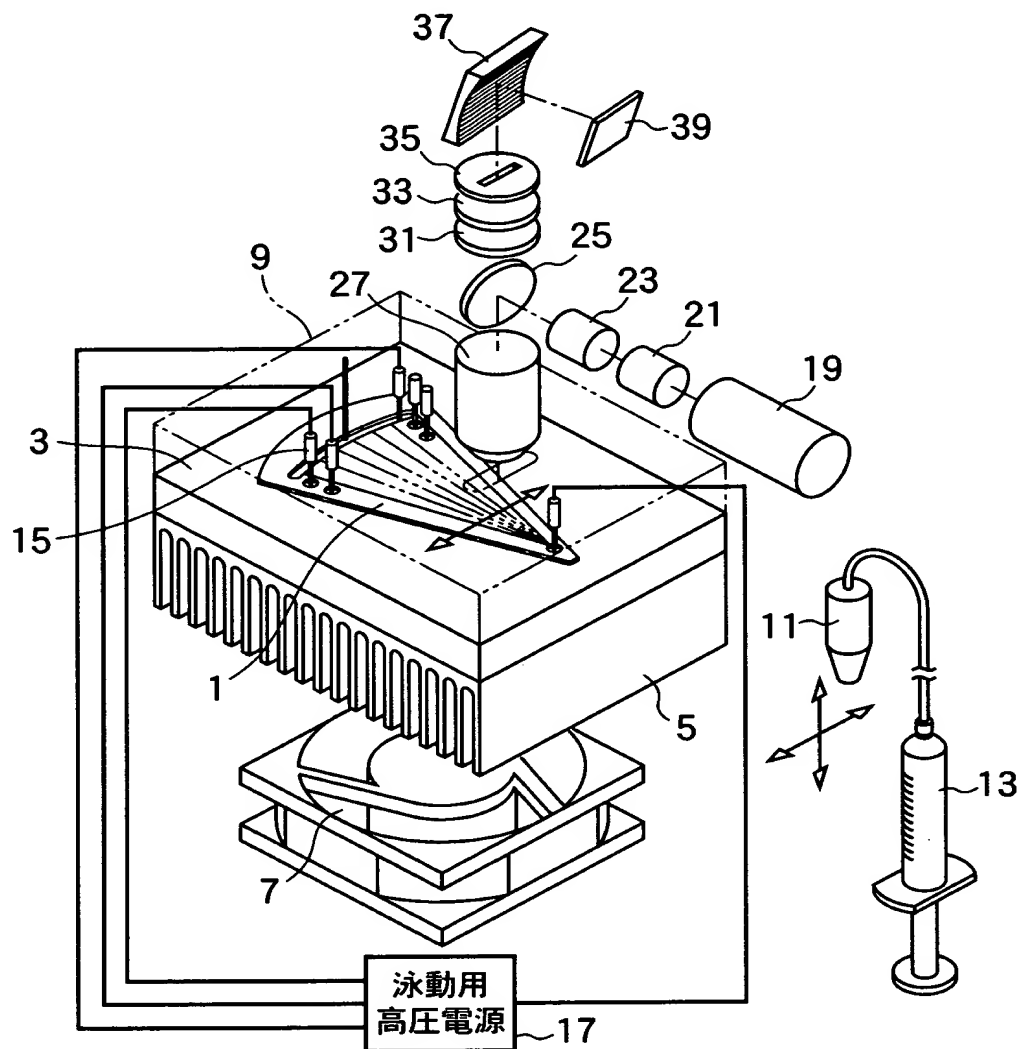
チップデバイスを用いた電気泳動装置に適用された従来の蛍光検出装置を示す斜視図である。

【符号の説明】

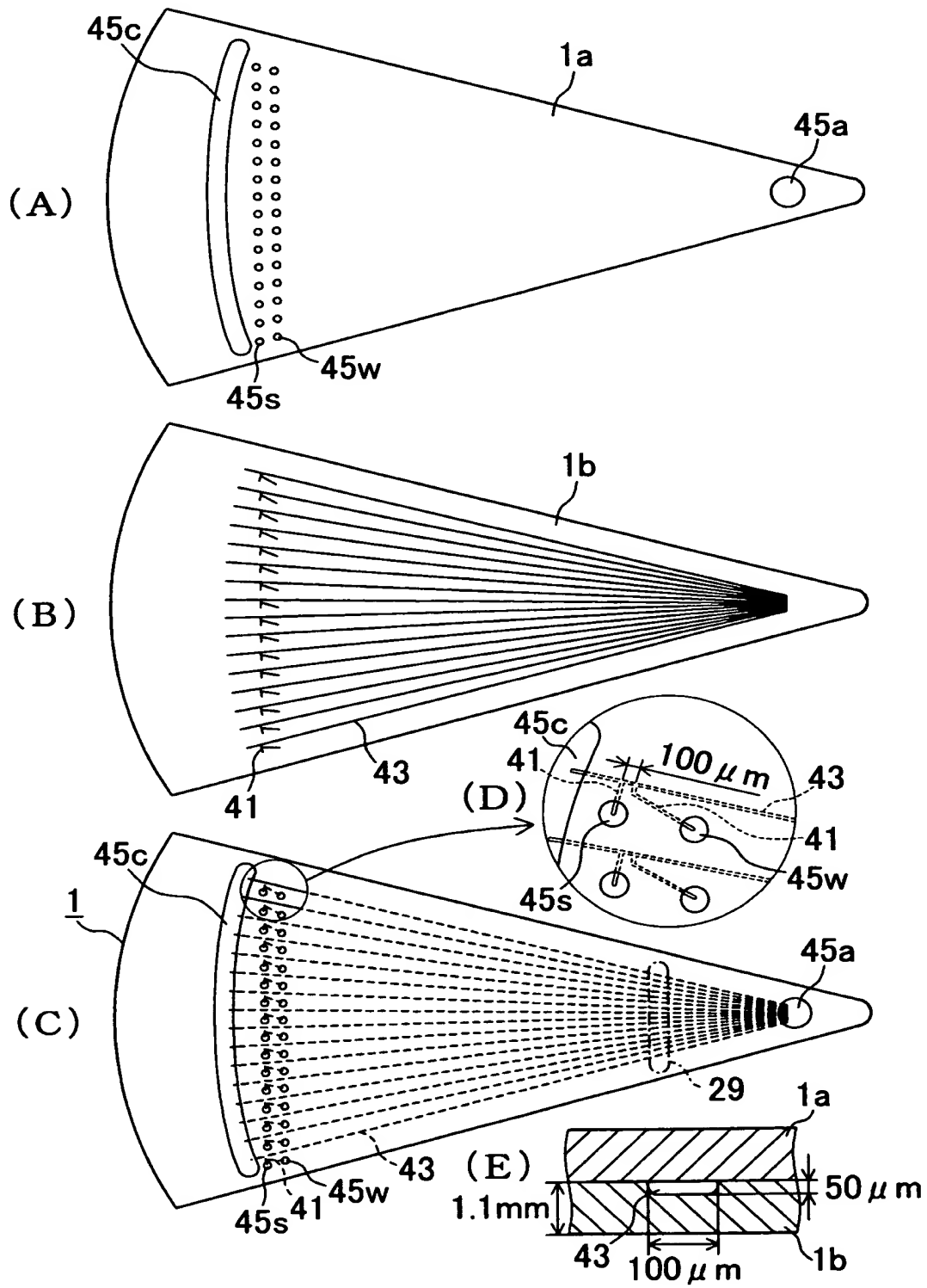
- 1 チップデバイス
- 3 チップデバイス保持台
- 5 ペルチエ式温調機構
- 7 ファン
- 9 泳動チャンバー蓋
- 1 1 ポリマー充填ポート
- 1 3 ポリマー充填用シリンジ
- 1 5 電極
- 1 7 高電圧供給部
- 1 9 励起光源レーザ装置
- 2 1 ビームエキスパンダ
- 2 3 ビームスキャニング素子
- 2 5 ダイクロイックミラー
- 2 7 対物レンズ
- 2 9 検出領域
- 3 1 除去フィルター
- 3 3 レンズ
- 3 5 スリット
- 3 7 凹面ホログラフィックグレーティング（反射型凹面格子）
- 3 9 冷却CCD

【書類名】 図面

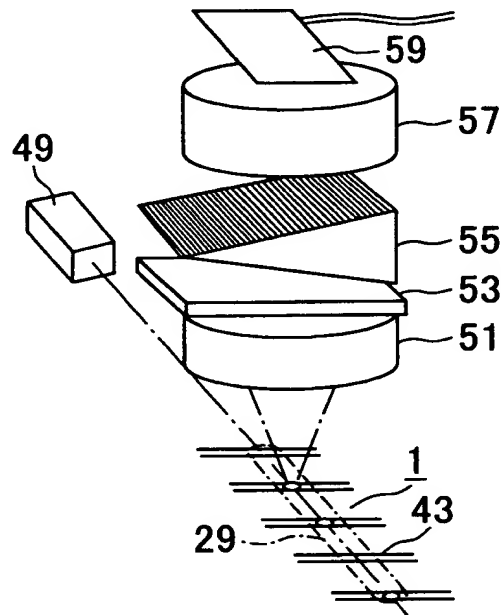
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 蛍光検出装置の検出信号の S/N を向上させる。

【解決手段】 励起光源レーザ装置 1 9 からの励起光をビームエキスパンダ 2 1、ビームスキャニング素子 2 3、ダイクロイックミラー 2 5 及び対物レンズ 2 7 により励起光を検出領域に照射する。検出領域からの光を対物レンズ 2 7 により集光し、平行光にしてダイクロイックミラー 2 5 を介して除去フィルター 3 1 に送る。フィルター 3 1 はダイクロイックミラー 2 5 からの光のうち、励起光成分を除去してレンズ 3 3 に送る。レンズ 3 3 はフィルター 3 1 からの蛍光をスリット 3 5 の長穴に集光する。スリット 3 5 の長穴を通過した蛍光は凹面ホログラフィックグレーティング 3 7 に照射される。グレーティング 3 7 はスリット 3 5 からの蛍光を分光し、CCD 3 9 の受光面に結像する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001993]

1. 変更年月日	1990年 8月27日
[変更理由]	新規登録
住 所	京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
氏 名	株式会社島津製作所